

0-732849-1

На правах рукописи

ЗАРИПОВ СЕРГЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**НАЧАЛЬНЫЕ ЭТАПЫ МИКРОБНОГО
МЕТАБОЛИЗМА 2,4,6-ТРИНИТРОТОЛУОЛА**

03.00.07-Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

С.З. Зарипов

Казань – 2002

Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского государственного университета им. В.И.Ульянова-Ленина

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор
Р.П. Наумова

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор
Л. П. Хохлова

Кандидат биологических наук, старший
научный сотрудник

М. Н. Давыдова

Ведущая организация:

Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов РАН

Защита состоится «14» ноября 2002г. в 14⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д.212.081.13 при Казанском государственном университете им. В.И.Ульянова-Ленина, 420008, г.Казань, ул. Кремлёвская, д. 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного университета

Автореферат разослан 9 октября 2002г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета,
кандидат биологических наук

А.Н. Аскарова

А.Н.Аскарова

Актуальность проблемы. Охрана окружающей среды и природных ресурсов от загрязнения веществами антропогенного происхождения, способными аккумулироваться в живых организмах и вызывать нежелательные изменения обменных процессов, является актуальной проблемой современности.

Среди синтетических веществ, загрязняющих биосферу, большую категорию представляют ароматические нитросоединения, к которым относится 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ). Большое количество ТНТ было произведено во время Второй Мировой войны, однако большая часть этого загрязнителя почвы сохранилась до настоящего времени. Даже по истечении 50 лет после загрязнения почвы ТНТ обнаруживался в ней в значительных концентрациях, вплоть до 9600 мг/кг (George et al., 2000). Столь медленная скорость биологической трансформации и биодеградациии ТНТ может свидетельствовать об ингибировании ксенобиотиком метаболической активности микроорганизмов.

Основным путём биотрансформации ТНТ является его восстановительное превращение. Согласно данным многих авторов, большинство аэробных бактерий осуществляют его восстановление с образованием моноаминопроизводных (McCormick et al., 1976; Naumova et al., 1979; Spanggard et al., 1981; Duque et al., 1993; Crawford, 1995; Rieger, Knackmüss, 1995; Fuller, Maning, 1997; Hawari et al., 1998; Vorbeck et al., 1998; Kalafut et al., 1998). Наиболее полное восстановление ТНТ до 2,4,6-триаминотолуола зафиксировано лишь у строго анаэробных микроорганизмов (Preuss et al., 1992; Funk et al., 1993; Lewis et al., 1997; Khan et al., 1997; Hawari et al., 1998). Несмотря на то, что ряд исследований продемонстрировал принципиальную возможность частичной минерализации данного соединения (Funk et al., 1993; Michels, Gotshalk, 1994), крайне низкий уровень этой минерализации в естественных и экспериментальных условиях свидетельствует о существовании метаболических барьеров на ключевых этапах превращений. Поэтому актуальной остается проблема ограниченного ферментативного воздействия большинства микроорганизмов на данный ксенобиотик, а также факторов, контролирующих эти процессы и препятствующих минерализации ТНТ и его вовлечению в циклы углерода и азота. В связи с этим важное значение имеет прогнозирование поведения этого соединения в природных сферах и в живых организмах. Для объективной оценки механизмов, ограничивающих его трансформацию, необходимо изучить начальные этапы превращения ТНТ широким кругом микроорганизмов, поскольку именно эти этапы могут быть ответственны за торможение метаболизма данного соединения и его токсические эффекты.

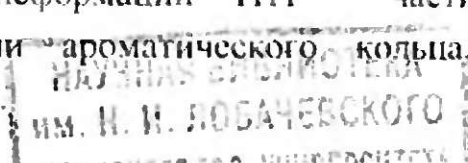
Ограниченная трансформация ТНТ привлекает внимание и в связи с тем, что образование первичных интермедиатов трансформации нитроариллов может быть основой их метаболической активации, ответственной за токсические и генотоксические эффекты исходных соединений (Neumann et al., 1995, Spanggord et al., 1995). В этой связи актуальны исследования, направленные на выявление «узких мест», лимитирующих метаболизм ТНТ, который может служить моделью поведения токсичных и мутагенных полинитроароматических соединений.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы - выявить наиболее характерные для прокариот и низших эукариот механизмы начального воздействия на ТНТ. Были поставлены следующие задачи:

- выделить из различных местообитаний, и прежде всего из антропогенных экологических ниш, микроорганизмы с разной степенью устойчивости к ТНТ;
- провести сравнительную оценку чувствительности к ТНТ и активности трансформации данного вещества у микроорганизмов, относящихся к различным физиолого-таксономическим группам;
- охарактеризовать особенности начальных этапов трансформации ТНТ широким кругом прокариот и низших эукариот;
- оценить характер и степень токсического действия ТНТ и его метаболитов на *Paramecium caudatum*.

Научная новизна. В настоящей работе создана коллекция микроорганизмов, принадлежащих к различным физиолого-таксономическим группам, устойчивых к высоким концентрациям 2,4,6-тринитротолуола и активно его трансформирующих. Получены данные в пользу гипотезы о разной чувствительности грамположительных и грамотрицательных бактерий к токсическому действию ТНТ. Продemonстрировано селекционирующее действие ТНТ на структуру микробного сообщества в направлении доминирования грамотрицательных бактерий. Вопреки общепринятой концепции метаболизма ТНТ у самых разных представителей биоты – от бактерий до человека базирующейся на моноаминопроизводных как основных продуктах превращений, наши результаты убедительно свидетельствуют о наиболее общем механизме ограниченной начальной трансформации ТНТ, сопряженном с аккумуляцией гидроксиламинодинитротолуолов.

На примере дрожжей продемонстрирована новая модель реализации альтернативных путей начальной трансформации ТНТ – частичного восстановления или нитрогруппы, или ароматического кольца, или комбинации обоих указанных механизмов.



Выявлено стимулирующее влияние азота на продукцию гидридного комплекса ТНТ (Н-ТНТ), и дефицита кислорода - на аккумуляцию ГАДНТ.

Путем экспресс-тестирования острой токсичности выявлены принципиальные различия путей альтернативной восстановительной атаки ТНТ с позиций его детоксикации.

Практическая значимость. Полученные данные о трансформации ТНТ широким кругом микроорганизмов могут быть использованы при создании эффективных технологий биоремедиации ТНТ-загрязненных объектов. В этой связи актуальны данные о превращении ТНТ большинством микроорганизмов в экологически опасные метаболиты – гидроксиламинопроизводные, обладающие токсическими и генотоксическими свойствами. Поскольку часть изученных в нашей работе микроорганизмов выделена из объектов, имеющих непосредственный контакт с человеком (продукты питания, воздух, почва) вполне реальна опасность проникновения этих токсичных и мутагенных интермедиатов нитровосстановления ТНТ в человеческий организм.

Метаболический потенциал штамма *Candida* sp AN-L13, сочетающий способность к утилизации ТНТ в качестве источника азота с возможностью утилизировать сырую нефть и ряд индивидуальных алифатических и ароматических углеводородов, а также выявление микроорганизмов с аналогичными метаболическими возможностями заслуживают особого внимания с позиций биоремедиации территорий, загрязненных и взрывчатыми веществами, и нефтепродуктами.

Токсикологическое тестирование альтернативных путей трансформаций ТНТ свидетельствует о важной роли пути через восстановление ароматического ядра ТНТ, который позволяет избежать резкого повышения острой токсичности уже на первом этапе трансформации ксенобиотика, что привлекательно с точки зрения создания катаболического потенциала для эффективной биодegradации ТНТ.

Апробация работы. Основные результаты диссертации представлены: на 2 международном симпозиуме "Biodegradation of Nitroaromatics Compounds & Explosives" (USA, 1999); 5 международной конференции "Environmental contamination on central and eastern Europe" (Prague, 1999); 5 международной конференции "Environmental pollution – ICER-2001", (Volgograd-Perm, 2001); VII Съезде физиологического общества им. И.П.Павлова (Казань, 2001); XII юбилейной конференции «Ферменты микроорганизмов» (Казань, 2001); 5 Пушкинской конференции молодых ученых «Биология - наука 21 века» (Пушино, 2001); II научной конференции молодых ученых, аспирантов и

студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета (Казань, 2001).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи, 10 тезисов докладов и методическое пособие.

Структура и объем работы. Диссертация включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, изложение результатов исследования и их обсуждение, заключение, выводы и перечень цитируемой литературы. Работа изложена на 109 страницах машинописного текста, включает 2 таблицы и 24 рисунка. Цитируемая литература включает 131 источник, из них 104 иностранных.

Материалы и методы

1. Микроорганизмы и условия культивирования. В работе использовали микроорганизмы, выделенные из различных источников, таких как нефтезагрязненная почва, нефтешлам – твердый отход нефтехимических производств, воздух, пекарские дрожжи, а также коллекционные штаммы. Выделение индивидуальных ТНТ-трансформирующих штаммов проводили после четырехкратного пассирования накопительных культур на синтетической среде А (г/л дистиллированной воды): глюкоза - 5, $MgSO_4$ – 0.25, Na_2HPO_4 – 4.5, KH_2PO_4 – 3.0, $(NH_4)_2SO_4$ – 1.0, дрожжевой экстракт – 0.05, pH 7.0, с ТНТ в концентрациях 25-200 мг/л. Выделение дрожжевых штаммов из препарата пекарских дрожжей проводили на среде Б (г/л дистиллированной воды): глюкоза - 10.0, $MgSO_4$ – 0.25, NaCl – 0.125, Na_2HPO_4 – 8.7, KH_2PO_4 – 5.3, $(NH_4)_2SO_4$ – 1.3, pH 6.0, ТНТ – 0.1.

Способность микроорганизмов использовать ТНТ в качестве источника азота испытывали на средах А и Б без сульфата аммония, концентрация ТНТ составляла 100 мг/л.

Аэробные гетеротрофные бактерии выращивали на мясопептонной среде, молочнокислые бактерии - на среде Рогозы (Rogosa et al., 1951). Дрожжи культивировали на среде Сабуро следующего состава (г/л): глюкоза – 10, дрожжевой экстракт – 10, пептон – 5, NaCl – 1.

2. Чувствительность штаммов к ТНТ испытывали, культивируя их на соответствующих жидких средах с различными концентрациями ТНТ (15-200 мг/л). Рост оценивали по поглощению при 600 нм.

3. Изучение трансформации ТНТ микроорганизмами

3.1 Трансформация ТНТ растущими культурами

Культивирование бактерий проводили во встряхиваемых (120 об/мин) конических колбах емкостью 250 мл, содержащих 50 мл среды А. Дрожжи выращивали на синтетической среде Б. Аэробное культивирование

проводили во встряхиваемых (120 об/мин) конических колбах емкостью 250 мл, содержащих 50 мл среды Б. Культивирование в стационарных условиях проводили в пробирках с высоким (16 см) слоем среды. Доза ТНТ в среде была равна его максимальной концентрации, совместимой с ростом конкретного штамма. В качестве посевного материала использовали 24-часовые культуры выращенные на соответствующих средах без ТНТ. Оптическая плотность после внесения инокулюма составляла 0,02.

Количество клеточной массы оценивали по оптической плотности (A_{600}), контролем служила освобожденная от клеток культуральная или инкубационная жидкости.

После инкубации при 30°C клетки осаждали и в супернатанте определяли ТНТ и его метаболиты.

3.2 Трансформация ТНТ клеточными суспензиями

Клетки, выращенные в жидкой среде соответствующего состава до поздней экспоненциальной фазы роста, осаждали центрифугированием (5000g, 15 мин), отмывали 16мМ фосфатным буфером (pH5.0 для дрожжей и лактобацилл, pH7.0 для бактерий), суспендировали в соответствующем буфере до оптической плотности $A_{600}=1.0$. ТНТ вносили в виде спиртового раствора из расчета 100 мг/л инкубационной смеси. В качестве основного потенциального источника восстановительных эквивалентов инкубационные смеси содержали 5мМ глюкозы. По завершении заданного времени инкубации при 30°C клетки осаждали центрифугированием (5000g, 15 мин) и в супернатанте анализировали ТНТ и продукты его трансформации методами ТСХ и ВЭЖХ.

В аэробном варианте трансформацию ТНТ проводили во встряхиваемых (120 об/мин) колбах объемом 250 мл, содержащих по 50 мл инкубационной смеси. В стационарном варианте термостатирование проводили в пробирках с высоким (16 см) слоем инкубационной жидкости. После инкубации при 30°C клетки осаждали и в супернатанте определяли ТНТ и его метаболиты.

4. Определение острой токсичности

Острую токсичность определяли с использованием модифицированного экспресс-теста на *Paramecium caudatum* (Selivanovskaya et al., 1997). Тест-реакцией является смертность тест-организма после экспозиции 10 особей парамеций в 0.3 мл тестируемой жидкости в течение 1 ч; в качестве контроля использовали фосфатный буфер (16 мМ, pH 6.0). Анализ проводили одновременно в пятикратной повторности. Результаты считаются достоверными, если гибель инфузорий в контрольных вариантах не превышала 5%.

После подсчета особей в каждом варианте находили среднее арифметическое количество выживших инфузорий. Затем рассчитывали тест-параметр – процент погибших особей по отношению к исходному количеству инфузорий.

При определении острой летальной токсичности инкубационных жидкостей (стандартных растворов) устанавливали среднюю летальную кратность разбавлений (среднюю летальную концентрацию), вызывающую гибель 50% тест-объектов в течение 1ч – ЛКр₅₀ (ЛД₅₀). Для этого тест-параметр выражали в условных единицах (пробитах), а кратность разбавления – в логарифмических величинах.

5. Химические анализы

ВЭЖХ-анализ ТНТ и продуктов его нитровосстановления проводили с использованием жидкостного хроматографа LKB2150, оснащенного обращенно фазовой колонкой (4.0 x 240 мм, 4 мкм – Spherysorb OD52, LKB), детектором длин волн (254 нм) и контроллером (Pharmacia LKB Biotechnology, Швеция). Элюцию проводили в изократическом режиме системой растворителей метанол-вода (40:60). Скорость растворителя 1.0 мл/мин, температура 30°C. Для анализа Н-ТНТ элюцию проводили системой ацетонитрил-вода (45:55) с 20мМ тетрабутиламоний иодида в качестве ион-парного компонента, скорость элюции 1,0 мл мин⁻¹, детекция при 546 нм.

УФ-видимый спектр поглощения гидридного комплекса ТНТ регистрировали на спектрофотометре Lambda 35 (PerkinElmer) после исчерпывающей экстракции неполярных компонентов инкубационных смесей диэтиловым эфиром и хлороформом.

Пробы для разделения и идентификации 2- и 4-изомеров ГАДНТ после осаждения клеток экстрагировали трижды двумя объемами диэтилового эфира. Экстракты обезвоживали сульфатом натрия, высушивали, перерастворяли в 20 мкл диэтилового эфира и метаболиты разделяли на ТСХ-пластинах (Silica Gel F₂₅₄, Merck) методом предложенным Вангом с соавторами (Wang et al., 1997).

Для идентификации метаболитов применяли масспектрометрический анализ и ЯМР-спектрометрию (Наумов с соавт., 1999).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основным исходным источником микроорганизмов служил твердый отход нефтехимического производства – нефтешлам (ОАО «Нижнекамскнефтехим», Татарстан). Исходная численность гетеротрофных бактерий в нефтешламе составляла около $1,6 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г сухого веса шлама, при четком доминировании грамположительных бактерий (95%).

Рост сообщества на ТНТ-содержащей минеральной среде привел к изменению соотношения грамположительных и отрицательных бактерий. Так, если в отсутствие ТНТ доля грамположительных бактерий практически не изменилась и составила 85-90%, то присутствие ТНТ в среде приводило к сокращению этого показателя - до 30% при концентрации ТНТ 25 мг/л. Наибольшие изменения претерпело сообщество при концентрации ТНТ 200 мг/л: к началу стационарной фазы роста доля грамположительных бактерий сократилась до 7-9% (рис. 1).

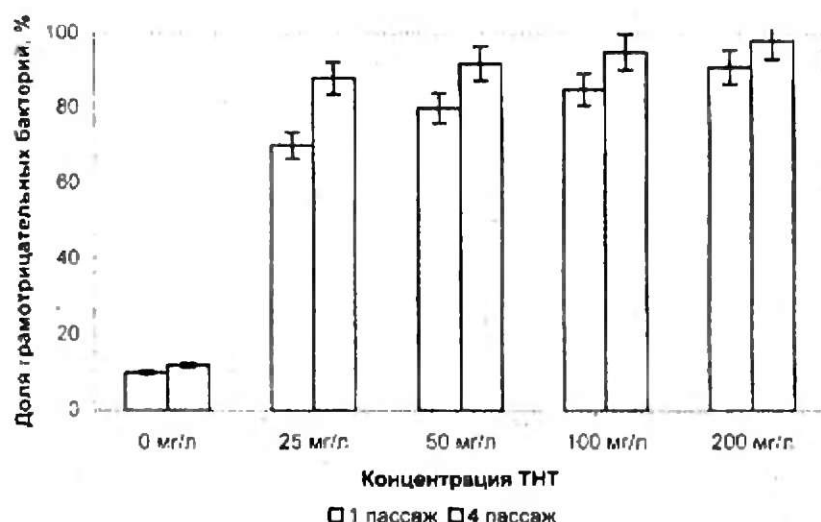


Рис. 1 Доля грамотрицательных бактерий в микробном сообществе нефтешлама при пассировании на ТНТ содержащих средах.

Ранее Фуллером и Майнингем было показано, что загрязнение почвы тротилом приводит к уменьшению доли грамположительных бактерий (Fuller, Manning, 1998),

снижению численности

микромикетов и

увеличению количества спор бактерий в загрязненной почве.

Вероятно, под действием тротила происходит гибель микроорганизмов, неустойчивых к его токсическому действию (главным образом грамположительных бактерий), тогда как грамотрицательные бактерии, устойчивые к высоким концентрациям ТНТ, начинают доминировать в составе сообщества.

После четвертого пассажа из накопительных культур, подвергшихся действию ТНТ, выделены 25 штаммов микроорганизмов, относящихся к различным таксономическим группам (грам-отрицательные бактерии, главным образом представители рода *Pseudomonas*, грамположительные бактерии, в том числе бациллы). Кроме того, из других природных источников нами выделены еще 5 штаммов микроорганизмов. Из химически загрязненного воздуха методом Коха на МПА + ТНТ (100 мг/л) были выделены 2 штамма грамположительных бактерий, отнесенных к роду *Sarcina*. Из препарата пекарских дрожжей выделены два ТНТ-устойчивых штамма дрожжей (*Saccharomyces* sp. ZS-A1 и *Saccharomyces* sp. ZS-A3). Выделенные из нефтезагрязненных торфяников (Лангелас, Тюменская обл.)

как деструкторы широкого ряда нефтяных углеводородов два представителя рода *Candida* оказались устойчивыми к концентрации ТНТ 100 мг/л.

Оценка токсического действия ТНТ на изучаемые штаммы по ингибированию роста в его присутствии на жидких минеральных средах показала, что наиболее устойчивы штаммы грамотрицательных бактерий. Минимальная концентрация ТНТ, полностью ингибирующая их рост (за исключением штамма *Pseudomonas sp. EN1561*) находилась в диапазоне 100-200 мг/л, в то время как в случае грамположительных штаммов — на уровне 15-100 мг/л, причем наиболее устойчивыми из последних оказались два изолята лактобацилл — *L. farciminis BS3605* и *L. plantarum BS3606*: их рост был совместим с концентрацией ТНТ 120 мг/л. Ингибирование роста дрожжей в присутствии ТНТ на уровне 150 мг/л составило для разных штаммов около 80-100% (табл. 1).

Трансформация ТНТ клеточными суспензиями. Поскольку покоящиеся клетки более устойчивы к ТНТ, чем клетки растущих культур, его трансформацию изучали с использованием клеточных суспензий при исходной концентрации ксенобиотика 100 мг/л. За время эксперимента (5 ч) большинство грамотрицательных штаммов осуществили превращение большей части (86-100%) этой достаточно высокой концентрации ТНТ (табл. 1). В свою очередь, грамположительные бактерии из категории аэробных гетеротрофов трансформировали за то же время 65-86 % ТНТ, а аэротолерантные возбудители молочнокислого брожения продемонстрировали широкий диапазон его убыли — от 21 до 100%. Для дрожжей тот же показатель составил от 85 до 100% (табл. 1).

Наиболее важный феномен, выявленный нами в данной работе — ограниченное воздействие большинства штаммов микроорганизмов на ТНТ, сопряженное с образованием изомерных ГАДНТ в качестве основных продуктов трансформации (табл. 1), тогда как уровень образования соединений с хотя бы одной полностью восстановленной нитрогруппой (АДНТ) не превышал 14% от концентрации исходного ксенобиотика, а в подавляющем большинстве случаев составлял 0-3%. Это относится и к грамположительным, и к грамотрицательным бактериям, а также микроэукариотам — дрожжам. Кроме того, выявлено ингибирующее влияние кислорода на процесс нитроредукции, что проявилось в снижении уровня образования ГАДНТ и АДНТ в условиях принудительной аэрации по сравнению со стационарными условиями.

Анализ изомеров гидроксиламино- и моноаминопроизводных ТНТ позволил установить, что у подавляющего большинства изолятов и

коллекционных штаммов происходило восстановление нитрогруппы в положении 4, тогда как образование 2ГАДНТ зафиксировано лишь у шести штаммов, 2АДНТ – у двух. Кроме того, у двух штаммов при ТСХ-анализе эфирных экстрактов, предложенном ранее Вангом с соавторами (Wang et al., 1997), удалось обнаружить продукт дальнейшей нитроредукции – 2,4-дигидроксиламино-6-нитротолуол (ДГАНТ).

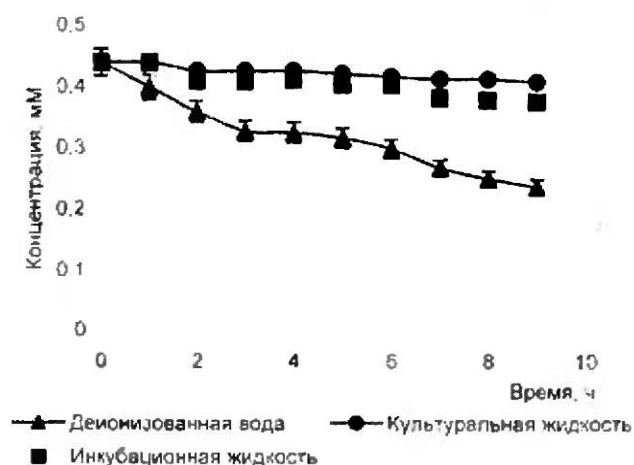


Рис. 2 Стабильность ГАДНТ в растворах.

Наряду с масштабным образованием ГАДНТ, заслуживает внимания тот факт, что данные метаболиты обнаруживаются в инкубационных и культуральных жидкостях продолжительное время. Однако Вангом с соавторами (Wang et al., 2000) показано, что ГАДНТ нестабильны в водных растворах в присутствии молекулярного

кислорода и, вероятно, окисляются до нитрозопроизводных, которые образуют димеры (2,2'-азокси и 4,4'-азокси производные) с исходным ГАДНТ. Как видно из рис. 2, ГАДНТ действительно нестабильны в деионизованной воде, однако их растворы в культуральной и инкубационной жидкостях гораздо более устойчивы, о чем свидетельствует сохранение их концентрации в ходе 9-часовой инкубации. Это может быть следствием наличия в культуральной/инкубационной жидкости соединений биологического происхождения, предотвращающих окисление ГАДНТ.

Что касается возможности четырехэлектронного восстановления второй нитрогруппы с образованием ДГАНТ, то три из изученных нами штаммов обнаружили способность к такому восстановлению. Однако полностью исключать возможность образования данного метаболита другими штаммами нельзя, поскольку ДГАНТ известен своей крайней неустойчивостью в водных растворах (Wang et al., 2000), поэтому он мог превратиться в другие соединения во время манипуляций, связанных с его идентификацией.

Трансформация ТНТ в ростовых условиях. Опыты проводили на жидкой минеральной среде, содержащей ТНТ в концентрации, равной его максимальной дозе, совместимой с ростом данного штамма. Результаты свидетельствуют о том, что растущие клетки изучаемых штаммов на первых этапах трансформации также образуют изомерные гидроксиламинодинитро-

Таблица 1 Чувствительность к ТНТ в ростовых условиях и активность его трансформации клеточными суспензиями

Штаммы	Источ- ник ¹	Чувстви- тельность к ТНТ ²	Трансфор- мировано ТНТ ³	Метаболиты, мМ		
				ГАДНТ	АДНТ	Н-ТНТ
Грамположительные бактерии						
<i>Bacillus sp. ZS19</i>	1	50	80	0,19	0	0,09
<i>Bacillus cereus ZS18</i>	1	85	84	0,13	0	0,03
<i>Sarcina sp. IC1</i>	2	100	86	0,25	0,04	0
<i>Sarcina sp. IC2</i>	2	100	80	0,31	0,01	0
EN14	1	30	84	0,17	0,02	0,02
EN17	1	50	70	0,18	0,02	0,04
EN1201	1	50	84	0,14	0,05	0
EN811	1	25	86	0,25	0,007	0
<i>Bacillus subtilis JH642</i>	4	15	70	0,04	0,02	0
<i>B. intermedius 7P</i>	4	25	65	0,10	0,003	0
<i>B. circulans BCF-247</i>	4	15	70	0,11	0	0
<i>B. thuringiensis var. subtoxicus</i>	4	35	80	0,13	0,01	0
<i>B. intermedius 10-41</i>	4	15	76	0,13	0,003	0
<i>Lactobacillus. brevis BS 3602</i>	3	25	100	0,43	0	0
<i>L. buchneri BS3603</i>	3	25	100	0,41	0	0
<i>L. farciminius BS3605</i>	3	120	100	0,40	0	0
<i>L. plantarum BS3606</i>	3	120	66	0,13	0	0
<i>L. plantarum BS3607</i>	3	80	34	0,03	0	0
<i>L. plantarum BS3608</i>	3	80	21	0,02	0	0
Грамотрицательные бактерии						
<i>Pseudomonas aeruginosa ZS31</i>	1	150	100	0,36	0	0
<i>Pseudomonas fluorescens ZS32</i>	1	200	100	0,37	0,009	0
<i>Pseudomonas putida ZS41</i>	1	100	100	0,38	0,004	0
<i>Pseudomonas sp. ZS50</i>	1	150	100	0,20	0	0,08
<i>Pseudomonas putida ZS61</i>	1	200	100	0,29	0,009	0
<i>Pseudomonas putida ZS71</i>	1	200	100	0,27	0,009	0
<i>Pseudomonas sp. ZS81</i>	1	150	100	0,35	0	0,06
<i>Pseudomonas fluorescens ZS82</i>	1	150	100	0,35	0,004	0
<i>Pseudomonas sp. EN1582</i>	1	200	100	0,24	0	0
<i>Pseudomonas sp. EN1561</i>	1	50	50	0,13	0	0
ZS10	1	100	100	0,35	0	0,08
ZS20	1	150	100	0,41	0	0,02
ZS42	1	125	100	0,40	0	0,03
ZS62	1	150	100	0,29	0,004	0,04
ZS72	1	150	100	0,27	0,004	0
ZS180	1	150	100	0,16	0	0
EN21	1	150	86	0,23	0,004	0
EN22	1	100	98	0,29	0,008	0
EN1181	1	100	94	0,31	0,021	0
Дрожжи						
<i>Saccharomyces sp. PD1</i>	3	100	100	0,39	0,01	0,02
<i>Saccharomyces sp. PD3</i>	3	100	90	0,37	0,008	0,04
<i>Candida sp. PD2</i>	3	100	100	0,01	0	0,36
<i>Candida sp. L13</i>	1	150	85	0,03	0	0,40
<i>Candida sp. L14</i>	1	100	89	0,14	0	0,28

¹ Источники выделения штаммов: 1 - нефтестимулированная почва, 2 - воздух, 3 - продукты питания, 4 - из коллекции НИИБФ КГУ.

² Максимальная концентрация ТНТ (мг/л) в питательной среде, совместная с ростом штамма.

³ Частичная концентрация 100 мг/л.

толуолы, однако уровень их образования в 1,3 – 2,3 раза ниже по сравнению с клеточными суспензиями.

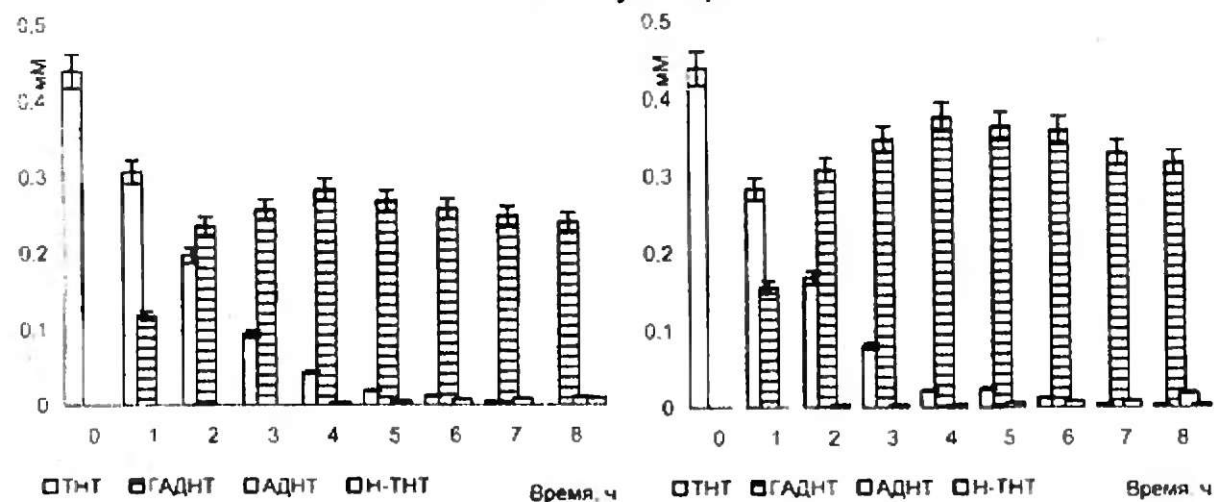
С другой стороны, растущие культуры данных микроорганизмов осуществляли сравнительно более глубокую восстановительную трансформацию, о чем свидетельствовало увеличение уровня моноаминопроизводных - до 0,05-0,15 μM , что в 7-26 раз выше уровня образования этих метаболитов в клеточных суспензиях. В отличие от клеточных суспензий, в ростовых условиях происходило лишь транзитное образование гидроксиламинопроизводных, которые подвергались дальнейшей трансформации. При этом, хотя конечными идентифицированными метаболитами превращения ксенобиотика растущими клетками являлись изомерные моноаминопроизводные, однако абсолютное количество последних было в большинстве случаев несоизмеримо низким по сравнению с уровнем предшествующих ГАДНТ.

Трансформация ТНТ дрожжами как модель сочетания альтернативных механизмов атаки ксенобиотика.

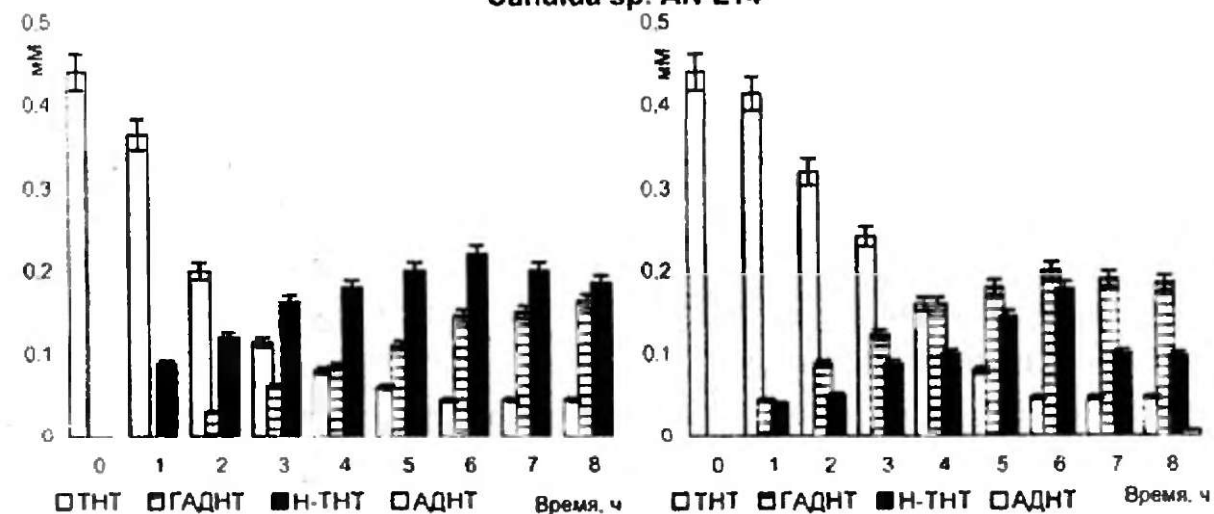
Дифференциальная оценка трансформации ТНТ клеточными суспензиями ферментирующих (*Saccharomyces* sp. ZS-A1) и дышащих (*Candida* sp. AN-L13 и *Candida* sp. AN-L14) дрожжей представлена на рис. 3. Независимо от условий, при которых инкубировались клеточные суспензии, ТНТ во всех случаях подвергался восстановительной трансформации (рис. 3).

Большой интерес представляет способность различных штаммов дрожжей трансформировать основную часть ТНТ альтернативными восстановительными путями. Так, *Saccharomyces* sp. ZS-A1 осуществлял конверсию данного соединения главным образом в ГАДНТ, при этом стационарные условия более предпочтительны для восстановления нитрогруппы, нежели аэробная инкубация: соотношение ГАДНТ/ТНТ достигало 0.81 и 0.65, соответственно (рис. 3). Напротив, трансформация ТНТ штаммом *Candida* sp. AN-L13 сопровождалась почти стехиометрической аккумуляцией Н-ТНТ (рис. 3). Пропорции Н-ТНТ/ТНТ через 64 от начала инкубации составили 0.93 в аэробных и 0.77 в стационарных условиях. В свою очередь, *Candida* sp. AN-L14 демонстрировала комбинацию альтернативных путей восстановительной атаки ТНТ (рис. 3). Примечательно, что стимулирующий эффект аэрации на образование Н-ТНТ данным штаммом был аналогичен таковому в случае *Candida* sp. AN-L13, тогда как аккумуляция ГАДНТ увеличивалась в стационарных условиях, как это имело место в варианте с *Saccharomyces* sp. ZS-A1.

Saccharomyces sp. ZS-A1



Candida sp. AN-L14



Candida sp. AN-L13

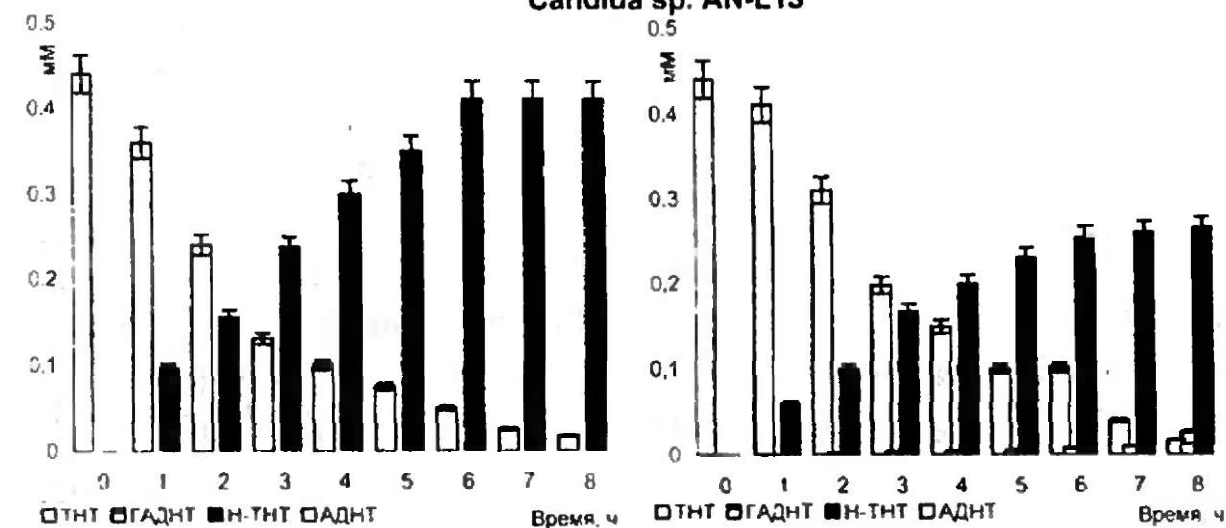


Рис. 3 Динамика трансформации ТНТ клеточными суспензиями дрожжей в аэробных (справа) и стационарных (слева) условиях

Что касается АДНТ, то их небольшое количество (не более 4% от первоначального ТНТ) обнаружено лишь на последующем этапе эксперимента с клеточными суспензиями (рис. 3).

Продуцирующий Н-ТНТ штамм *Candida sp.* AN-L13 способен в известной

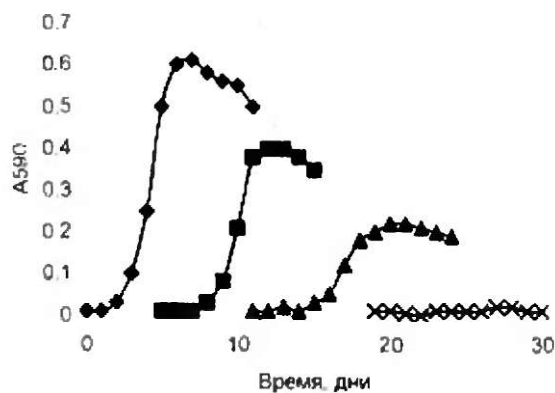


Рис. 4 Ослабление роста *Candida sp.* AN-L13 при пассировании на среде с ТНТ в качестве единственного источника азота.

мере утилизировать ТНТ как единственный источник азота (рис. 4). Однако, повторная экспозиция этого штамма в процессе последовательных пассажей на ТНТ (0.44 мМ)-содержащей синтетической среде приводила к закономерному снижению роста. Аналогичную тенденцию наблюдали Ворбек с соавторами (Vorbeck et al., 1998) в отношении трех штаммов бактерий, выделенных из

загрязненных почв.

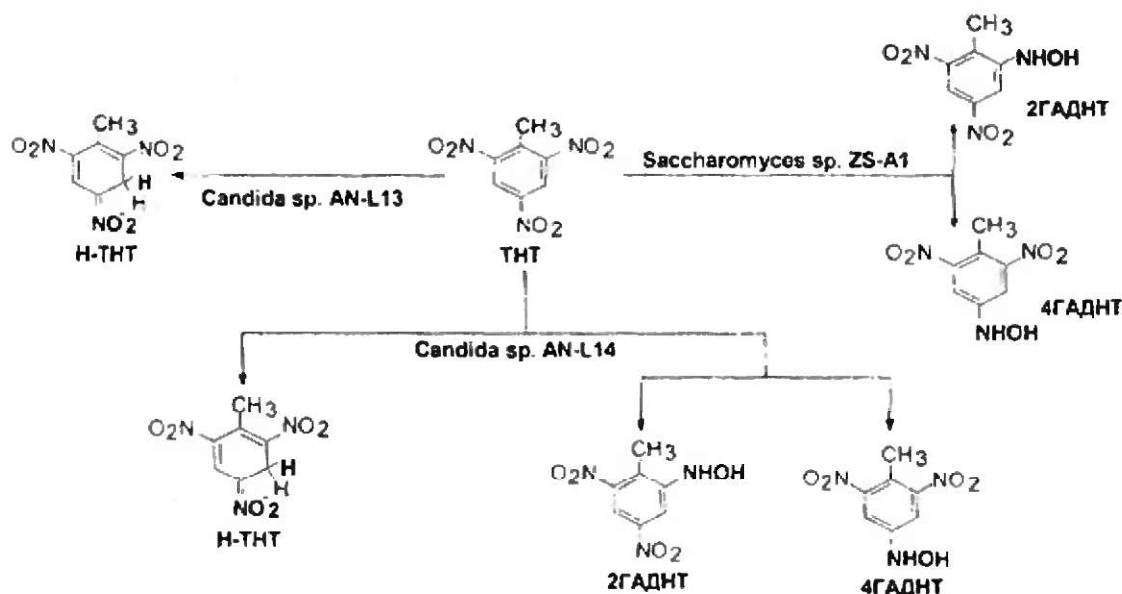


Рис. 5 Схема начальной трансформации ТНТ дрожжами.

Некоторые другие штаммы дрожжей (из коллекции Казанского университета) были использованы для качественного тестирования на соответствие представленной схеме (рис. 5). Действительно, три штамма сахаромикетов трансформировали ТНТ в той или иной мере в ГАДНТ (2- и 4-

изомеры), в то время как дополнительно испытанные представители рода *Candida* (*Candida* sp. AN-L7, *Candida* sp. AN-L20) образовывали смесь ГАДНТ и Н-ТНТ. Однако, аналогов штамма *Candida* AN-L13 с его практически однонаправленным восстановлением ароматического ядра к настоящему времени не обнаружено.

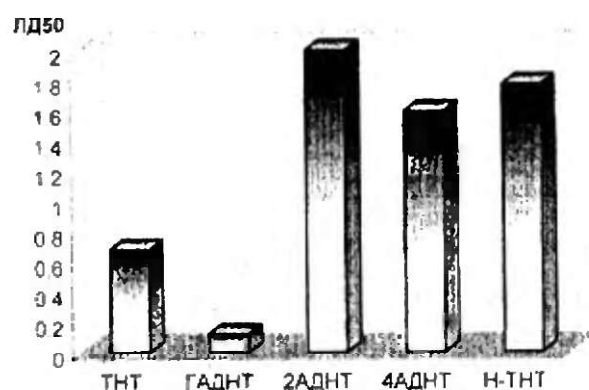


Рис. 6 Острая токсичность ТНТ и его возможных метаболитов.

Токсикологические аспекты микробной трансформации 2,4,6-тринитротолуола. Исходя из результатов оценки токсичности химических стандартов ТНТ, ГАДНТ и Н-ТНТ (рис. 6), можно было предполагать, что наиболее токсичными будут инкубационные смеси, содержащие ГАДНТ в качестве основного метаболита трансформации ТНТ клеточными суспензиями

Saccharomyces sp. SZ-A1. Действительно, наибольшая смертность *Paramecium caudatum* выявлена в данном варианте опыта (рис. 7). Напротив, наиболее низкий уровень летального эффекта наблюдался в случае накопления Н-ТНТ под действием клеточных суспензий *Candida* sp. AN-L13, что согласуется с наименьшей степенью острой токсичности химически синтезированного гидридного комплекса Мейзенхеймера. В свою очередь, комбинированный состав метаболитов ТНТ, продуцируемых *Candida* sp. AN-L14 и соотношение Н-ТНТ и ГАДНТ (рис. 3), соответствует промежуточной степени острой токсичности, определенной в случае данного штамма (рис. 7).

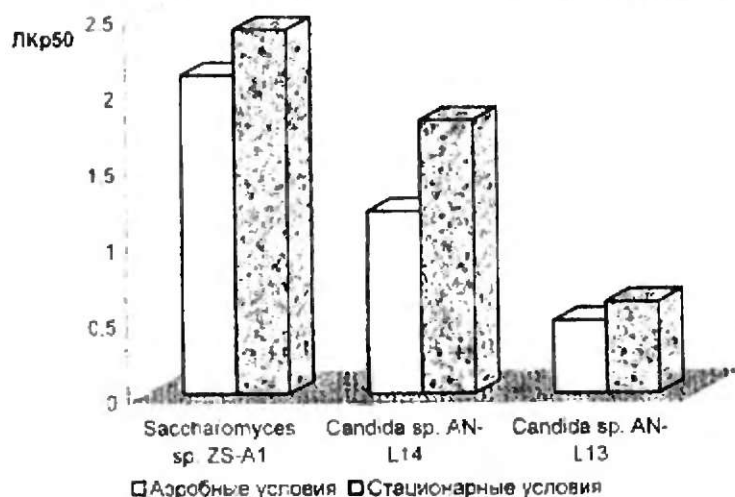


Рис. 7 Острая токсичность инкубационных жидкостей во время максимальной аккумуляции специфических метаболитов

Острая токсичность химического стандарта ГАДНТ и соответствующих инкубационных смесей согласуется с ингибирующим действием этих соединений на лигнин-пероксидазу *Phanerochaete chrysosporium* (Michels, Gottschalk, 1994) и на ключевые дегидрогеназы (3-фосфоглицеринового альдегида и глюкозо-6-фосфата) гликолиза и пентозофосфатного пути (Наумов с соавт., 1999).

Вероятно, именно гидроксиламинопроизводные ТНТ как наиболее токсичные метаболиты могут быть ответственными за резкое сокращение микробного разнообразия твердого отхода нефтехимического производства (нефтешлама), которое мы наблюдали под воздействием ТНТ.

Комбинация обоих путей восстановления ТНТ наблюдалась ранее у *Rhodococcus erythropolis* HL PM-1 (Vorbeck et al., 1998) и *Enterobacter cloacae* PB2 (French et al., 1998). Что же касается почти исключительного восстановления ТНТ в гидридный комплекс Мейзенхеймера, то этот феномен обнаружен нами впервые на примере *Candida* sp. AN-L13.

Токсикологическое тестирование, проведенное в соответствии с предложенной схемой альтернативной атаки ТНТ (рис. 5), свидетельствует о важной роли пути через восстановление ароматического ядра ТНТ, который позволяет избежать резкого повышения острой токсичности уже на первом этапе трансформации ксенобиотика. Эти результаты подтверждают прогноз (Lenke et al., 2000) о привлекательной роли пути, ведущего к Н-ТНТ, с точки зрения создания катаболического потенциала для эффективной биodeградации ТНТ.

Кстати, штамм *Candida* sp. AN-L13, изолированный ранее А.В. Наумовым в числе доминирующих микроорганизмов из нефтезагрязненных торфяников (Лангепас, Западная Сибирь), может утилизировать сырую нефть и ряд индивидуальных алифатических и ароматических углеводородов. С учетом этого, данный штамм и микроорганизмы с аналогичными метаболическими возможностями заслуживают особого внимания с позиций биоремедиации территорий, загрязненных и взрывчатыми веществами, и нефтепродуктами.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что начальные этапы трансформации ТНТ большинством микроорганизмов сопряжены с образованием продуктов неполного нитровосстановления – гидроксиламинодинитротолуолов (ГАДНТ).
2. Концентрации аминодинитротолуолов (АДНТ) несоизмеримо меньше первоначального накопления ГАДНТ. В сочетании с обнаружением у ряда микроорганизмов интермедиатов частичного восстановления второй нитрогруппы – дигидроксиаминонитротолуолов это позволяет предполагать, что АДНТ не находится на главном пути аэробной трансформации ТНТ.
3. На примере дрожжей продемонстрирована модель реализации альтернативных механизмов начальной атаки ТНТ – частичного восстановления или одной из нитрогрупп, или ароматического кольца молекулы, ведущего к образованию гидридного комплекса ТНТ (Н-ТНТ).

4. Трансформация ТНТ в ГАДНТ сопровождается резким (10-кратным) возрастанием острой летальной токсичности на *Paramecium caudatum*, в то время как альтернативная конверсия ТНТ - Н-ТНТ сопряжена со снижением летального эффекта по сравнению с исходным ксенобиотиком.
5. Выделенный из замазученных торфяников штамм *Candida sp. AN-L13* не имеет аналогов среди известных микроорганизмов по способности к детоксикации ТНТ благодаря его почти стехиометрическому превращению в Н-ТНТ и частичному использованию в качестве единственного источника азота.

Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Зарипов С.А., Наумов А. В., Никитина Е. В., Наумова Р. П. Альтернативные пути начальной трансформации 2,4,6-тринитротолуола дрожжами. // Микробиология. – 2002. т.71, №5.
2. Зарипов С.А., Наумов А.В., Суворова Е.С., Никитина Е.В., Гарусов А.В., Наумова Р.П. Особенности метаболизма 2,4,6-тринитротолуола у различных групп микроорганизмов. // Деп. ВИНТИ, 04.12.2001, 2524-B2001. – 27с.
3. Якушева О.И., Никитина Е.В., Частухина И.Б., Зарипов С.А., Суворова Е.С., Наумова Р.П. Микрофлора нефтешлама отхода нефтехимического производства // Вестник татарстанского отделения Российской экологической академии. - 2001, - № 1-2, - Р.45-50.
4. Зарипов С.А., Абдрахманова Ю.Ф., Наумова Р.П. Начальные этапы микробной трансформации 2,4,6-тринитротолуола. // Сборник статей "International Environmental Summer School", 3-24 августа 2002г., Екатеринбург, т.1, с. 10-21.
5. Наумова Р.П., Селивановская С.Ю., Черепнева И.Е., Заринова С.К., Гарусов А.В., Зарипов С.А. Методическое пособие. Экспресс-тест на основе *Paramecium caudatum* в экологическом мониторинге. Казань: изд-во КГУ, 2000. 15с.
6. Naumov A.V., Suvorova E.S., Boronin A.M., Zarirov S.A., Naumova R.P. Initial stages of TNT conversion by fermentative microorganisms // 2nd International Symposium «Biodegradation of Nitroaromatics compounds & Explosives», USA. - 1999. – P. 221.
7. Zarirov S.A., Nikitina E.V., Naumov A.V., Suvorova E.S., Leonicheva E.V., Naumova R.P. Resistance of air bacteria to the nitroaromatic xenobiotics in relation to pigments production// 5th international symposium "Environmental contamination on central and eastern Europe", Czech Republic, Prague. - 1999. – P. 145.
8. Yakusheva O.I., Zarirov S. A., Naumov A.V., Suvorova E.S., Naumova R.P. Petrochemical waste sludge as a source of metabolically active and extremotolerant microorganisms. // 5th international symposium "Environmental contamination on central and eastern Europe" Czech Republic, Prague. - 1999. – P. 147.
9. Zarirov S.A., Naumov A.V., Suvorova E.S., Ivanshin V.A., Naumova R.P. Metabolic barrier to the pathway of microbial conversion of specific environmental pollutant 2,4,6-trinitrotoluene // 5th international conference "Environmental pollution – ICEP-2001", Volgograd-Perm, Russia. 2001, - P. 117.

10. Якушева О.И., Зарипов С.А., Никитина Е.В., Частухина И.Б., Суворова Е.С., Наумова Р.П. Нефтешлам как источник микроорганизмов-деструкторов ксенобиотиков. // Тезисы докладов международной конференции «Экология и жизнь - 2000». – Великий Новгород, 2000. – С.2.
11. Суворова Е. С., Зарипов С. А., Никитина Е. В., Наумова Р. П., Наумов А. В. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и 3-фосфоглицеральдегиддегидрогеназа - мишень для токсического действия нитроариллов // Тезисы докладов VII Съезд Физиологического Общества им. И.П.Павлова. - Казань, 2001. - С.635-636.
12. Суворова Е.С., Зарипов С.А., Скипина И.М., Наумова Р.П. Блокирование ключевых оксидоредуктаз нитроариллами/ //Сборник докладов XII юбилейной конференции «Ферменты микроорганизмов». - Казань, 2001. - С.81.
13. Скипина И.М., Хамитов Б.Р., Гильмутдинов Г.З., Гарусов А.В., Зарипов С.А. Дegrадация тонарола (2,4-ди-трет-бутил-4-метилфенола) у *Pseudomonas arvilla* MT (pWWO) с участием ферментов тол-пути // Сборник докладов XII юбилейной конференции «Ферменты микроорганизмов». - Казань, 2001. - С.147.
14. Суворова Е. С., Зарипов С. А., Наумов А. В. Формирование пула восстановленных кофакторов - мишень для токсического действия нитроариллов // Сборник тезисов 5-й пушкинской конференция молодых ученых «Биология - наука 21 века», 16-20 апреля. - Пушкино, 2001г. - С.294.
15. Суворова Е.С., Зарипов С.А., Абдрахманова Ю.Ф., Наумова Р.П. Выделение и очистка нитроредуктаз из штамма *Lactobacillus fermentum* BS3601 // Тезисы докладов IV Республиканской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, Казань, 2001, - с.120.

